



jc971 U.S. PTO
09/912559



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 52 319.6

Anmeldetag: 21. Oktober 2000

Anmelder/Inhaber: Aventis Behring GmbH, Marburg/DE

Bezeichnung: Mutante der den Faktor VII aktivierenden Protease

Priorität: 10. Oktober 2000 DE 100 50 040.4

IPC: C 12 N, C 12 Q, A 61 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 8. Mai 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon

5 **Mutante der den Faktor VII aktivierenden Protease**

10 Die Erfindung betrifft Mutanten der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden
Protease (FSAP), Verfahren zur Detektion der Mutanten auf Protein- sowie
RNA/DNA-Ebene und ihrer Verwendung.

15 Aus der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 ist bereits eine aus dem
Blutplasma isolierte Protease bekannt, die den Gerinnungsfaktor VII aktivieren
kann. Aufgrund dieses ersten Befundes wurde sie als Faktor VII aktivierende
Protease (FSAP) bezeichnet. Detaillierte Untersuchungen zeigten, dass FSAP
auch ein potenter Aktivator von Einketten-Plasminogenaktivatoren ist wie Pro-
20 urokinase oder Einketten-Gewebe-Plasminogenaktivator (sct-PA). Aufgrund die-
ser Eigenschaften wurden Anwendungsmöglichkeiten von FSAP beschrieben,
bspw. ihrer Anwendung als gerinnungsförderndes Mittel basierend auf der durch
F VII-Aktivierung unterstützten Beschleunigung der Coagulation. Allein oder in
Kombination mit Plasminogenaktivatoren kann FSAP auch zur Fibrinolyse An-
wendung finden, bspw. bei thrombotischen Komplikationen.

25 Wie in den deutschen Patentanmeldungen 199 03 693.4 und 199 26 531.3 be-
schrieben, wurden Tests zur Detektion der Protease entwickelt, die sowohl die
Quantifizierung des FSAP Antigengehaltes sowie deren Aktivität z.B. im Plasma
ermöglichen. Die Antigenbestimmung wird dabei vorzugsweise mittels eines E-
30 LISA-Tests durchgeführt. Die FSAP-Aktivität kann - wie in der deutschen Pa-

tentanmeldung 199 26 531.3 beschrieben - durch Quantifizierung der Aktivierung von Prourokinase zu Urokinase und deren Umsetzung eines chromogenen Substrats mit anschließender Differenzmessung der Extinktion erfolgen. Ein überraschender Befund bei Durchführung dieses Aktivitätstestes war, dass das
5 aus z.B. Plasma isolierte FSAP Proenzym bei den gewählten Inkubationsbedingungen aktiviert wurde und so die Aktivierung der Prourokinase ermöglichte. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass FSAP durch Eigenaktivierung in die aktivierte Form überführt wird und so bspw. Prourokinase oder den F VII aktivieren kann. Dies wird durch die oben genannten Inkubationsbedingungen,
10 nämlich neutraler bis alkalischer pH-Wert, Kalziumionen und Heparin noch unterstützt. Zudem weisen jüngste Ergebnisse darauf hin, dass Prourokinase/Urokinase (oder Ein- und Zweiketten-tPA) selbst eine Aktivierung von Einketten-FSAP hervorrufen oder unterstützen.

15 Unter Anwendung der beiden vorstehend genannten Testsysteme, nämlich dem ELISA- und dem Prourokinase-Aktivierungstest, wurden mehr als 180 Plasmen gesunder Blutspender untersucht. Dabei zeigte sich, dass in 5 bis 10% aller Proben eine gegenüber einen Plasmapool (aus mehr als 100 gesunden Spenden) oder dem Durchschnitt des gesamten Testkollektives eine deutlich erniedrigte Potenz der durch FSAP bewirkten Prourokinase-Aktivierung aufwiesen.
20

Dagegen wurden in der Mehrzahl dieser Spender (mit erniedrigter Aktivität) durchschnittliche FSAP-Antigenwerte gemessen. Es wurde daher vermutet, dass in den untersuchten Blutproben eine oder mehrere Modifikationen des
25 FSAP enthalten sein könnten, die eingeschränkte oder fehlende Aktivitäten zur Folge hätten. Dies könnte in Polymorphismen in der Bevölkerung, also einer oder mehrerer Mutationen in den FSAP-Strukturen, die sich in einer Änderung der FSAP-Aminosäuresequenz zeigen, begründet sein, wie schon in der deutschen Patentanmeldung 199 26 531.3 vermutet wurde. Die in der Regel um 50
30 bis 70% gegenüber dem Durchschnittswert aller untersuchten Spender ernied-

5 rigten Aktivitäten weisen auf eine heterozygote Mutation hin. Dies könnte sich phenotypisch durch wahrscheinlich paritätische Anwesenheit beider FSAP's, nämlich der Wildtyp-FSAP und der mutanten Variante, im Plasma ausprägen. Angenommen, die mutierte Variante hätte die Eigenschaft (nahezu) völlig eingebüßt, Prourokinase zu aktivieren, so würde im Mittel eine ungefähr halbierte Aktivität messbar werden. Darüber hinaus wurden jedoch auch schon pseudo-homozygote Ausprägungen heterozygoter Mutationen anderer Proteine beschrieben, bei denen lediglich das mutierte Protein detektierbar war, welches aber als solches nur einen Teil der entsprechend detektierten biologischen Ei-
10 genschaft eingebüßt hatte.

15 Um auszuschließen, dass der Mangel oder die Verminderung unbekannter potentieller Kofaktoren für die festgestellte Einbuße der FSAP-Aktivität verantwortlich war, wurden FSAP-Proben von drei Spendern gereinigt, die bei wiederholten Spenden eine signifikant erniedrigte Aktivität gezeigt hatten. Die hochgereinigten Proteine zeigten gegenüber der aus dem Plasmapool gereinigten FSAP ebenfalls eine deutlich verminderte Aktivität. Dies reduzierte die Wahrscheinlichkeit eines Kofaktoreinflusses und erhöhte die einer Proteinmodifikation im oben genannten Sinne. Überraschend war der Befund, dass die Potenz zur Aktivierung von Faktor VII nicht eingeschränkt zu sein scheint. Aus diesem Grunde
20 sind solche Mutanten besonders für die oben genannte Anwendung als gerinnungsförderndes Mittel - wie in der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 beschrieben - geeignet, da deren fibrinolytisches Potential offenbar limitiert ist. Diese Mutanten können basierend auf den im folgenden beschriebenen Erkenntnissen der Nukleotidsequenz-Änderungen rekombinant oder transgen hergestellt werden. Sie können aber auch ebenso wie das entsprechende FSAP-Protein (Ein- oder Zweiketten-FSAP) aus natürlichen Quellen wie Blutplasma direkt isoliert werden. In den deutschen Patentanmeldungen 199 03 693.4, 199
25 37 219.5 und 199 37 318.7 wurden bereits Verfahren beschrieben, die die Herstellung von FSAP erlauben, bevorzugt mit Hilfe der Immunabsorption, wie es in
30

der deutschen Patentanmeldung 100 36 641.4 im einzelnen erläutert ist. Die bisher verwendeten monoklonalen Antikörper unterscheiden jedoch so weit bekannt nicht zwischen dem Wildtyp und dem Mutanten des FSAP. Entsprechend können monoklonale Antikörper, die spezifisch mit den Mutanten reagieren, zur Herstellung der Mutanten verwendet werden. Dabei können die Antikörper durch Immunisierung mit der Mutante gewonnen werden. Außerdem können Peptide mit Proteinregionen, die den Aminosäuren 389 bis 397 (...SFRVQKIFK...) und/oder 534 bis 539 (...EKRPGV...) der SEQ. ID No. 3 des Sequenzprotokolls entsprechen, nach bekannten Methoden zur Immunisierung und Generierung entsprechender Antikörper verwendet werden. Außerdem finden diese Antikörper auch Anwendung zur spezifischen Detektion dieser Mutanten, z.B. als Reagenzien in Nachweisverfahren wie ELISA, Western Blots, in der Immunhistologie oder beim Fluorescence Assisted Cell Sorting (=FACS).

Dagegen können Antikörper, die spezifisch für den FSAP-Wildtyp sind bzw. gegen die entsprechenden Aminosäuresequenzen des Wildtyps gerichtet sind, z.B. gegen die Aminosäuresequenzen 389 bis 397 (...SFRVEKIFK...) und/oder gegen die Aminosäuresequenz 534 bis 539 (...GKRPGV...) gerichtet sind vor allem in humanisierter Form als Pharmazeutikum zur prophylaktischen oder therapeutischen Inhibition der FSAP-Aktivität verwendet werden, um bspw. Blutungen zugrundeliegenden Hyperfibrinolyse entgegenzuwirken. Außerdem können diese Antikörper auch zur Reinigung, Detektion und Differenzierung der Wildtyp-FSAP in der oben beschriebenen Weise verwendet werden.

Die genomische Sequenz des FSAP wurde in der Genbank unter der Accession No. AC 006097 durch Abgleich mit der bekannten cDNA-Sequenz (Choi-Miura, Accession No. S 83182) identifiziert und dabei Intron- und Exon-Sequenzen abgeleitet. Insgesamt wurden 12 Primerpaare entworfen, um die kodierenden Sequenzen in spezifischen PCR-Reaktionen zusammen mit einem kleinen Teil der jeweils flankierenden Intron-Sequenzen amplifizieren zu können.

Zunächst wurde die genomische DNA aus Blut von 2 Probanden mit erniedrigter und von 4 Probanden mit normaler Prourokinase-Aktivität isoliert, mit allen Primerpaaren amplifiziert und anschließend unter Verwendung der PCR-Primer die DNA-Sequenz bestimmt. Das Ergebnis ist in Tab. 1 dargestellt. Insgesamt 4 Nukleotidpositionen in der kodierenden Region waren polymorph, d.h. an diesen Stellen werden zwei Basen gleichzeitig nachgewiesen. Es ist daher davon auszugehen, dass in diesen Fällen Heterozygosität vorliegt, mit einem Wildtyp- und einem mutanten Allel. Zwei davon (an Position 183 und 957) sind Drittbasenaustausche, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führen. Die beiden anderen, die nur in der DNA der Probanden mit erniedrigter Prourokinase-Aktivität gefunden wurden, führen zu Aminosäureaustauschen wie in Tab. 1 dargestellt.

Tabelle 1

DNA-Sequenz an Nukleotidpositionen*					
Proband Nr.	ProUK-Aktivität	183	957	1177	1601
S83182		T	G	G	G
9689	normal	T/C	G	G	G
9690	normal	T/C	G	G	G
9704	normal	T	G/A	G	G
9706	normal	T	G/A	G	G
9714	erniedrigt	T	G	G/C	G/A
9715	erniedrigt	T	G	G/C	G/A

* wobei 1 das A des Initiationskodons ist

Aminosäure an Position*					
Proband Nr.	ProUK-Aktivität	NT*: 183 AS*: 61	NT: 957 AS: 319	NT: 1177 AS: 393	NT: 1601 AS: 534
S83182		His	Lys	Glu	Gly
9689	normal	His	Lys	Glu	Gly
9690	normal	His	Lys	Glu	Gly
9704	normal	His	Lys	Glu	Gly
9706	normal	His	Lys	Glu	Gly
9714	erniedrigt	His	Lys	Glu/Gln	Gly/Glu
9715	erniedrigt	His	Lys	Glu/Gln	Gly/Glu

* NT - Nukleotidposition, AS - Aminosäureposition

Um die Korrelation der beiden Mutationen mit erniedrigter Prourokinase-Aktivität zu untersuchen, wurden die DNAs weiterer Personen an diesen Stellen sequenziert. Das Ergebnis ist in Tab. 2 zusammengefasst. Alle 6 Probanden mit erniedrigter Prourokinase-Aktivität waren heterozygot an der Nukleotidposition 1601 (Gly - Glu Austausch), vier hatten zusätzlich die Heterozygotität an der Position 1177 (Glu - Gln Austausch). Keiner der insgesamt 11 Probanden mit normaler oder am unteren Normalbereich befindlicher Prourokinase-Aktivität wie die oben genannte Heterozygotitäten auf. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass zumindest der Austausch an Aminosäureposition 534 ursächlich mit der erniedrigten Prourokinase-Aktivität zusammenhängt. Ob ein Aminosäureaustausch allein in der Position 393 eine Erniedrigung der Prourokinase-Aktivität zur Folge haben könnte, ist derzeit noch ungewiss.

Tabelle 2

DNA-Sequenz an Nukleotidposition			
Proband Nr.	ProUK-Aktivität	1177	1601
9714	niedrig	C/G	A/G
9715	niedrig	C/G	A/G
9802	niedrig	C/G	A/G
10032	niedrig	G	A/G
10039	niedrig	C/G	A/G
10047	niedrig	G	A/G
9698	Unterer Normalbereich	G	G
9702	Unterer Normalbereich	G	G
9711	Unterer Normalbereich	G	G
9712	Unterer Normalbereich	G	G
10038	Unterer Normalbereich	G	G
9689	normal	G	G
9690	normal	G	G
9704	normal	G	G
9706	normal	G	G
9803	normal	G	G
10043	normal	G	G

5 Gegenstand der Erfindung ist somit eine Mutante der DNA-Sequenz, die für die den Blutgerinnungsfaktor VII und Einketten-Plasminogenaktivatoren aktivierende Protease (FSAP) kodiert, die an der Nukleotidposition 1177 einen G/C-Basenaustausch und/oder an der Nukleotidposition 1601 einen G/A-Basenaustausch aufweist.

10

Die Nukleotidsequenz SEQ. ID No. 1 des beiliegenden Sequenzprotokolls gibt die Sequenz des Wildtyps wieder. Die DNA-Sequenz der Mutante mit beiden Austauschen an den Nukleotidpositionen 1177 und 1601 ist durch die SEQ. ID No. 2 des Sequenzprotokolls beschrieben. Die entsprechende Aminosäuresequenz des Wildtyps kann der SEQ. ID No. 3 des Sequenzprotokolls entnommen

15

werden. Die SEQ. ID No. 4 zeigt die Aminosäuresequenz der Mutante mit den beiden Aminosäureaustauschen (Glu - Gln 393 und Gly - Glu 534).

5 Mit dem Auffinden der im Sequenzprotokoll genannten DNA- und Aminosäuresequenzen sind die Voraussetzungen zur Entwicklung diagnostischer Verfahren zum Erkennen von Patienten mit genetisch bedingter hetero- oder homozygoter Expression des FSAP geschaffen worden. Man kann die Mutationen entweder in der genomischen DNA oder in der daraus abgeleiteten mRNA nachweisen. Der Nachweis gelingt aber auch auf der Proteinebene mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern, die gegen die Mutante mit der abgewandelten Aminosäuresequenz gerichtet sind.

10 Diagnostische Verfahren können erfindungsgemäß so durchgeführt werden, dass man

15

a) eine Probe, die die Mutante gemäß den Ansprüchen 3 oder 4 enthalten könnte, mit einem auf einem festen Träger fixierten ersten Antikörper gemäß Anspruch 7 inkubiert und danach wäscht, dann einen zweiten, markierten Antikörper gemäß Anspruch 7 oder gegen den Wildtyp gerichteten markierten Antikörper zugibt und abermals auswäscht und das vom zweiten Antikörper hervorgerufenen Signal misst oder

20

b) eine Probe, die die Mutante gemäß den Ansprüchen 3 oder 4 enthalten könnte, mit einem auf einem festen Träger fixierten ersten Antikörper gegen den Wildtyp inkubiert und danach wäscht, dann einen zweiten, markierten Antikörper gemäß Anspruch 7 zugibt und abermals auswäscht und das vom zweiten Antikörper hervorgerufenen Signal misst oder

25

c) auf einem Träger die auf das Vorliegen der Mutante gemäß den Ansprüchen 3 oder 4 zu untersuchende Probe fixiert und sie mit einem markier-

30

ten Antikörper gemäß Anspruch 7 allein oder in Mischung mit einem unmarkierten Antikörper und anschließendem Nachweis des markierten Antikörpers detektiert oder

- 5 d) einen auf einem Träger fixierten Antikörper gemäß Anspruch 7 mit einer auf das Vorliegen der Mutante gemäß den Ansprüchen 3 oder 4 zu untersuchenden Probe in Gegenwart einer markierten Mutante versetzt und das durch die Markierung hervorgerufene Signal misst.

- 10 Bevorzugt ist ein diagnostisches Verfahren, bei dem man die Aktivität der FSAP misst, indem man die die Protease enthaltende Probe an einem festen Träger inkubiert, den zuvor ein gegen die Protease gerichteter Antikörper nach Anspruch 7 gekoppelt wurde und nach Auswaschen des festen Trägers die fixierte Protease mit Reagenzien inkubiert, die deren Aktivitätsbestimmung erlaubt.

15

Dabei kann die Aktivität der Protease durch eine photometrische Bestimmung der bei der Einwirkung auf chromogene Substrate auftretenden Extinktion gemessen werden.

- 20 Es ist auch möglich, die Aktivität der Protease durch Messung

- ihrer die Blutgerinnungsfaktoren VII/VIIa und V/Va inaktivierende Wirkung oder

- 25 - ihre die Blutgerinnungszeiten verkürzende Wirkung in globalen Gerinnungstests oder

- ihrer Plasminogenaktivatoren aktivierende Wirkung oder

- 30 - ihre den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Wirkung zu bestimmen.

Schließlich stehen auch Verfahren zur Verfügung, bei denen die die Plasminogenaktivatoren aktivierende Wirkung gemessen wird, durch die Aktivierung der

5 - Einketten-Urokinase (scuPA, single chain urokinase plasminogen activator) oder des

 - Einketten-tPA (sctPA, single chain tissue plasminogen activator).

10 Zum Nachweis der für die Erniedrigung der Prourokinase-Aktivität verantwortlichen Mutationen auf DNA- und RNA-Ebene können Verfahren eingesetzt werden, wie sie auch zum Nachweis von single nucleotid polymorphisms angewendet werden, z.B.

15 - die cDNA-Amplifikation der RNA oder die Amplifikation der genomischen DNA und ihre anschließende Sequenzierung;

 - der Mutationsnachweis auf Ebene der cDNA oder genomischen DNA oder deren Amplifikate durch

20

-- die Hybridisierung mit sequenzspezifischen Sonden, die auch Markierungen zum Nachweis tragen können wie Enzyme, alkalische Phosphatase, HRP, und deren Substrate, Fluoreszenzfarbstoffe, auch Reporter-Quencher-Paare (wie

25 z.B. Scorpions, Molecular Beacons, TaqMan-Sonden), radioaktive Atome, Chromophore, Chemo- und Elektrochemolumineszenzmarkierungen) oder

-- durch Verfahren wie die selektive 2'-Amin-Acylierung, die elektrochemische Oxidation von Nukleinsäuren, durch "minor groove binder" Oligonukleotid-Konjugate oder durch die HPLC.

5 Auf der Grundlage der Untersuchungsergebnisse, die durch die vorstehend genannten Antigen- und Aktivitätstests erhalten wurden, konnten drei Gruppen von gesunden Spendern hinsichtlich potentieller Mutationen auf genomischer Ebene untersucht werden. Dazu wurde den Spendern Blut entnommen, und die Blutzelle durch Zentrifugation vom Plasma getrennt. Die Plasmen wurden dann
10 zur Quantifizierung der FSAP-Antigen- und Aktivitätsspiegel verwendet und entsprechend den letzteren in drei Gruppen unterteilt, nämlich in "hoch/durchschnittlich", "durchschnittlich/erniedrigt" und "signifikant erniedrigt". Die gewonnenen Blutzellen wurden dann zur DNA/RNA-Extraktion verwendet.

15 Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen ist nunmehr die rasche Detektion einer oder beider beschriebenen Mutationen, gleichgültig ob hetero- oder homozygoten Genotyps, auf der Ebene der entsprechenden FSAP-Nukleotidsequenz möglich. Während die vorstehend genannten Antigen- und Aktivitätstests in gesundem Zustand eines Spenders durchaus den Genotyp widerspiegeln, kann
20 dies bei Einflüssen auf die FSAP-Plasmaspiegel schwierig oder unmöglich werden. So können Parameter wie hormonelle Schwankungen, Lebensstil usw. besonders aber Krankheitszustände Antigen- und/oder Aktivitätsspiegel mehr oder minder stark beeinflussen. Wie in der deutschen Patentanmeldung 199 26 531.3 beschrieben, kann bei einem Herzinfarkt die messbare FSAP-Aktivität bei kaum
25 erhöhtem Antigengehalt deutlich gegenüber dem Normalwert ansteigen, wodurch Spender, die im gesunden Zustand eine erniedrigte FSAP-Aktivität aufweisen, nun als "durchschnittlich" erscheinen.

Bspw. sind Untersuchungen, ob Patienten mit FSAP-Mutation ein erhöhtes Risiko haben, thrombotische Komplikationen wie Herzinfarkte zu erleiden, aufgrund
30

der vorstehend genannten Beschränkungen nur schwer möglich. Dagegen können bspw. Leberinsuffizienzen zu erniedrigten Plasmaspiegeln führen, was ebenfalls zu Missinterpretationen der "wahren" genetischen Prädisposition führen kann. Ein Test auf FSAP-Mutationen auf DNA/RNA-Ebene ist dagegen von temporären Ereignissen unabhängig. Die Kombination aller genannten Assays ermöglicht ein komplettes Bild des Spenders/Patienten, nämlich die Beurteilung einer potentiellen Mutation und des akuten Zustandes hinsichtlich einer Beeinflussung des Antigen-Aktivitätsverhältnisses. Daraus können prophylaktische und therapeutische Maßnahmen resultieren.

SEQUENZPROTOKOLL

- 5 <110> Aventis Behring GmbH
<120> Mutanten der den Faktor VII aktivierenden Protease,
Verfahren zu deren Detektion und Verwendung
10 <130> C9P51(A10)
<140>
<141>
15 <160> 4
<170> PatentIn Ver. 2.1
20 <210> 1
<211> 1683
<212> DNA
<213> Homo sapiens
25 <400> 1

SEQ ID No. 1

```
30 atgtttgccaggatgtctgatctccatggtctgctgttaa tggctctggtgggaaagaca 60
gcctgtgggttctccctgatgtctttatttgaaagcctggacccagactg gacccctgac 120
cagtatgattacagctacgaggattataatcaggaagagaacaccagtagcacacttacc 180
catgctgagaatcctgactggtactacactgaggaccaagctgatccatgccagcccaac 240
ccctgtgaacacggtggggactgcctcgctcatggggagcacttcacatgcagctgcctg 300
gtccctttctctgggaataa gtgtcagaaa gtgcaaaaatcgtgcaaggacaacccatgt 360
ggccggggccaatgtctcat taccagagtctccctactaccgctgtgtctgtaaacac 420
ccttacacaggtccagctgctcccaagtgttctctgtatgcaggccaaa cccctgccag-480
aatggggctacctgtctcccggcataagcggagatccaagttcacctgtgcctgtcccgac 540
cagttcaaggggaaattctgtgaaatagggtcttgatgactgctatgttggcgatggctac 600
tcttaccgagggaaaatgaa taggacagtc aaccagcatgcgtgccttta ctggaactcc 660
caccctctcttgcaggagaa ttacaacatgtttatggaggatgctgaaac ccatgggatt 720
ggggaacacataattctgcagaaaccagatgcggacgaaa agccctgggtgctttattaaa 780
gltaccaatgacaaggtgaaatgggaatactgtgatgtctcagcctgtctagcccaggac 840
gttgccctaccagaggaaaagcccactgagccatcaaccaagcttccggggttttgactcc 900
45 tytgaaayactgagatagcagagaggaagatcaagagaa tctatggaggctttaagagc 960
acggcggggcaagcaccatgycagggctccctccagtcctcgtgcctctgaccatctcc 1020
atgccccagggccacttctgtggtggggcgctgatccaccctgctgggtgctcactgct 1080
gcccactgca ccgacataaa aaccagacatctaaagggtgtgctagggga ccaggacctg 1140
aagaaagaagaaatttcattgagcagagcttt agggtygaga agataltcaa gtacagccac 1200
50 tacaatgaaa gagatgagat tccccacaat gatattgcat tgcctcaagtt aaagccagt 1260
gatgtgactgtgtctctaga atccaaatacgtgaagactgtgtgcttgcc tgatgggtcc 1320
tttccctctggagtgagtgccacatctctggctgggggtttacagaaac aggaaaagg 1380
tccgcccagctccttgatgcaaaagtcaagctgattgccacactttgtgcaactcccgc 1440
caactctatgaccacatgatgtatgacagtatgatctgtgcaggaaatcttcagaaacct 1500
55 gggcaagacacctgccagggtgactcttgga gggcccctga cctgtgagaa ggacggcacc 1560
tactacgtctatgggatagtga gcttygggctgtaggtgtggaaagaggcc aggggtctac 1620
accaagtta ccaaattcctgaatttggatc aaagccacca tcaaaagtga aagtggcttc 1680
taa 1683
```

<210> 2
<211> 1683

5 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2

10 SEQ ID No. 2

```
atgtttgcca ggatgtctga tctccatggt ctgctgttaa tggctctggt gggaaagaca 60
gcctgtgggt tctccctgat gtctttattg gaaagcctgg acccagactg gacccctgac 120
cagtatgatt acagctacga ggattataat caggaagaga acaccagtag cacacttacc 180
catgctgaga atcctgactg gtactacact gaggaccaag ctgatccatg ccagcccaac 240
ccctgtgaac acggtgggga ctgcctcgtc catgggagca ccttcacatg cagctgcctg 300
gctcctttct ctgggaataa gtgtcagaaa gtgcaaaata cgtgcaagga caacccatgt 360
ggccggggcc aatgtctcat taccagagt cctccctact accgctgtgt ctgtaaacac 420
ccttacacag gtcccagctg ctcccaagtg gttcctgtat gcaggccaaa cccctgccag 480
aatggggcta cctgctcccc gcataagcgg agatccaagt tcacctgtgc ctgtcccgac 540
cagttcaagg ggaaattctg tgaaataggt tctgatgact gctatgttgg cgatggctac 600
tcttaccgag ggaaaatgaa taggacagtc aaccagcatg cgtgccttta ctggaactcc 660
cacctcctct tgcaggagaa ttacaacatg tttatggagg atgctgaaac ccatgggatt 720
ggggaacaca atttctgcag aaaccagat gcggacgaaa agccctggtg ctttattaaa 780
gttaccaatg acaagggtgaa atgggaatac tgtgatgtct cagcctgctc agcccaggac 840
gttgccctacc cagaggaaaag cccactgag ccatcaacca agcttcctggg gtttgactcc 900
tgtggaaaga ctgagatagc agagaggaag atcaagagaa tctatggagg ctttaagagc 960
acggcgggca agcacccatg gcaggcgtcc ctccagtcct cgctgcctct gaccatctcc 1020
atgccccagg gccacttctg tgggtggggcg ctgatccacc cctgctgggt gctcactgct 1080
gcccactgca ccgacataaa aaccagacat cttaaagggtg tgctagggga ccaggacctg 1140
aagaaagaag aatttcatga gcagagcttt aggggtgcaga agatattcaa gtacagccac 1200
tacaatgaaa gagatgagat tccccacaaat gatattgcat tgctcaagtt aaagccagtg 1260
gatggctact gtgctctaga atccaaatac gtgaagactg tgtgcttgcc tgatgggtcc 1320
tttccctctg ggagtgagt ccacatctct ggctgggggtg ttacagaaac agggaaaagg 1380
tcccgcagc tcctggatgc caaagtcaag ctgattgcca acactttgtg caactcccgc 1440
caactctatg accacatgat tgatgacagt atgactctgt caggaaatct tcagaaacct 1500
gggcaagaca cctgccaggg tgactctgga ggccccctga cctgtgagaa ggacggcacc 1560
tactacgtct atgggatagt gagctggggc ctgagtggtg agaagaggcc aggggtctac 1620
acccaagtta ccaaattcct gaattggatc aaagccacca tcaaaagtga aagtggcttc 1680
taa 1683
```

5 <210> 3
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

10 SEQ ID No. 3

Met Phe Ala Arg Met Ser Asp Leu His Val Leu Leu Leu Met Ala Leu
 1 5 10 15
 15 Val Gly Lys Thr Ala Cys Gly Phe Ser Leu Met Ser Leu Leu Glu Ser
 20 25 30
 Leu Asp Pro Asp Trp Thr Pro Asp Gln Tyr Asp Tyr Ser Tyr Glu Asp
 35 40 45
 20 Tyr Asn Gln Glu Glu Asn Thr Ser Ser Thr Leu Thr His Ala Glu Asn
 50 55 60
 25 Pro Asp Trp Tyr Tyr Thr Glu Asp Gln Ala Asp Pro Cys Gln Pro Asn
 65 70 75 80
 Pro Cys Glu His Gly Gly Asp Cys Leu Val His Gly Ser Thr Phe Thr
 85 90 95
 30 Cys Ser Cys Leu Ala Pro Phe Ser Gly Asn Lys Cys Gln Lys Val Gln
 100 105 110
 Asn Thr Cys Lys Asp Asn Pro Cys Gly Arg Gly Gln Cys Leu Ile Thr
 115 120 125
 35 Gln Ser Pro Pro Tyr Tyr Arg Cys Val Cys Lys His Pro Tyr Thr Gly
 130 135 140
 40 Pro Ser Cys Ser Gln Val Val Pro Val Cys Arg Pro Asn Pro Cys Gln
 145 150 155 160
 Asn Gly Ala Thr Cys Ser Arg His Lys Arg Arg Ser Lys Phe Thr Cys
 165 170 175
 45 Ala Cys Pro Asp Gln Phe Lys Gly Lys Phe Cys Glu Ile Gly Ser Asp
 180 185 190
 Asp Cys Tyr Val Gly Asp Gly Tyr Ser Tyr Arg Gly Lys Met Asn Arg
 195 200 205
 50 Thr Val Asn Gln His Ala Cys Leu Tyr Trp Asn Ser His Leu Leu Leu
 210 215 220
 55 Gln Glu Asn Tyr Asn Met Phe Met Glu Asp Ala Glu Thr His Gly Ile
 225 230 235 240
 Gly Glu His Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Glu Lys Pro Trp
 245 250 255
 60 Cys Phe Ile Lys Val Thr Asn Asp Lys Val Lys Trp Glu Tyr Cys Asp
 260 265 270

val ser Ala Cys ser Ala Gln Asp val Ala Tyr Pro Glu Glu ser Pro
 275 280 285
 5 Thr Glu Pro ser Thr Lys Leu Pro Gly Phe Asp ser Cys Gly Lys Thr
 290 295 300
 Glu Ile Ala Glu Arg Lys Ile Lys Arg Ile Tyr Gly Gly Phe Lys ser
 305 310 315 320
 10 Thr Ala Gly Lys His Pro Trp Gln Ala ser Leu Gln ser ser Leu Pro
 325 330 335
 Leu Thr Ile ser Met Pro Gln Gly His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile
 340 345 350
 15 His Pro Cys Trp val Leu Thr Ala Ala His Cys Thr Asp Ile Lys Thr
 355 360 365
 20 Arg His Leu Lys val val Leu Gly Asp Gln Asp Leu Lys Lys Glu Glu
 370 375 380
 Phe His Glu Gln ser Phe Arg val Glu Lys Ile Phe Lys Tyr ser His
 385 390 395 400
 25 Tyr Asn Glu Arg Asp Glu Ile Pro His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys
 405 410 415
 Leu Lys Pro val Asp Gly His Cys Ala Leu Glu ser Lys Tyr val Lys
 420 425 430
 30 Thr val Cys Leu Pro Asp Gly ser Phe Pro ser Gly ser Glu Cys His
 435 440 445
 35 Ile ser Gly Trp Gly val Thr Glu Thr Gly Lys Gly ser Arg Gln Leu
 450 455 460
 Leu Asp Ala Lys val Lys Leu Ile Ala Asn Thr Leu Cys Asn ser Arg
 465 470 475 480
 40 Gln Leu Tyr Asp His Met Ile Asp Asp ser Met Ile Cys Ala Gly Asn
 485 490 495
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Asp Thr Cys Gln Gly Asp ser Gly Gly Pro
 500 505 510
 45 Leu Thr Cys Glu Lys Asp Gly Thr Tyr Tyr val Tyr Gly Ile val ser
 515 520 525
 50 Trp Gly Leu Glu Cys Gly Lys Arg Pro Gly val Tyr Thr Gln val Thr
 530 535 540
 Lys Phe Leu Asn Trp Ile Lys Ala Thr Ile Lys ser Glu ser Gly Phe
 545 550 555 560
 55

5 <210> 4
<211> 560
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

10 SEQ ID No. 4

Met Phe Ala Arg Met Ser Asp Leu His Val Leu Leu Leu Met Ala Leu
1 5 10
15 Val Gly Lys Thr Ala Cys Gly Phe Ser Leu Met Ser Leu Leu Glu Ser
20 25 30
Leu Asp Pro Asp Trp Thr Pro Asp Gln Tyr Asp Tyr Ser Tyr Glu Asp
35 40 45
20 Tyr Asn Gln Glu Glu Asn Thr Ser Ser Thr Leu Thr His Ala Glu Asn
50 55 60
25 Pro Asp Trp Tyr Tyr Thr Glu Asp Gln Ala Asp Pro Cys Gln Pro Asn
65 70 75 80
Pro Cys Glu His Gly Gly Asp Cys Leu Val His Gly Ser Thr Phe Thr
85 90 95
30 Cys Ser Cys Leu Ala Pro Phe Ser Gly Asn Lys Cys Gln Lys Val Gln
100 105 110
Asn Thr Cys Lys Asp Asn Pro Cys Gly Arg Gly Gln Cys Leu Ile Thr
115 120 125
35 Gln Ser Pro Pro Tyr Tyr Arg Cys Val Cys Lys His Pro Tyr Thr Gly
130 135 140
40 Pro Ser Cys Ser Gln Val Val Pro Val Cys Arg Pro Asn Pro Cys Gln
145 150 155 160
Asn Gly Ala Thr Cys Ser Arg His Lys Arg Arg Ser Lys Phe Thr Cys
165 170 175
45 Ala Cys Pro Asp Gln Phe Lys Gly Lys Phe Cys Glu Ile Gly Ser Asp
180 185 190
Asp Cys Tyr Val Gly Asp Gly Tyr Ser Tyr Arg Gly Lys Met Asn Arg
195 200 205
50 Thr Val Asn Gln His Ala Cys Leu Tyr Trp Asn Ser His Leu Leu Leu
210 215 220
55 Gln Glu Asn Tyr Asn Met Phe Met Glu Asp Ala Glu Thr His Gly Ile
225 230 235 240
Gly Glu His Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Glu Lys Pro Trp
245 250 255
60 Cys Phe Ile Lys Val Thr Asn Asp Lys Val Lys Trp Glu Tyr Cys Asp
260 265 270

Val Ser Ala Cys Ser Ala Gln Asp Val Ala Tyr Pro Glu Glu Ser Pro
 275 280 285
 5 Thr Glu Pro Ser Thr Lys Leu Pro Gly Phe Asp Ser Cys Gly Lys Thr
 290 295 300
 Glu Ile Ala Glu Arg Lys Ile Lys Arg Ile Tyr Gly Gly Phe Lys Ser
 305 310 315 320
 10 Thr Ala Gly Lys His Pro Trp Gln Ala Ser Leu Gln Ser Ser Leu Pro
 325 330 335
 Leu Thr Ile Ser Met Pro Gln Gly His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile
 340 345 350
 15 His Pro Cys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Thr Asp Ile Lys Thr
 355 360 365
 20 Arg His Leu Lys Val Val Leu Gly Asp Gln Asp Leu Lys Lys Glu Glu
 370 375 380
 Phe His Glu Gln Ser Phe Arg Val Gln Lys Ile Phe Lys Tyr Ser His
 385 390 395 400
 25 Tyr Asn Glu Arg Asp Glu Ile Pro His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys
 405 410 415
 Leu Lys Pro Val Asp Gly His Cys Ala Leu Glu Ser Lys Tyr Val Lys
 420 425 430
 30 Thr Val Cys Leu Pro Asp Gly Ser Phe Pro Ser Gly Ser Glu Cys His
 435 440 445
 Ile Ser Gly Trp Gly Val Thr Glu Thr Gly Lys Gly Ser Arg Gln Leu
 450 455 460
 35 Leu Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Ala Asn Thr Leu Cys Asn Ser Arg
 465 470 475 480
 40 Gln Leu Tyr Asp His Met Ile Asp Asp Ser Met Ile Cys Ala Gly Asn
 485 490 495
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Asp Thr Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 500 505 510
 45 Leu Thr Cys Glu Lys Asp Gly Thr Tyr Tyr Val Tyr Gly Ile Val Ser
 515 520 525
 Trp Gly Leu Glu Cys Glu Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Gln Val Thr
 530 535 540
 50 Lys Phe Leu Asn Trp Ile Lys Ala Thr Ile Lys Ser Glu Ser Gly Phe
 545 550 555 560
 55

Patentansprüche:

- 5 1. Mutante der DNA-Sequenz, die für die den Blutgerinnungsfaktor VII und die Einketten-Plasminogenaktivatoren aktivierende Protease (FSAP) kodiert, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Mutante an der Nukleotidposition 1177 einen G/C-Basenaustausch und/oder an der Nukleotidposition 1601 einen G/A-Basenaustausch aufweist.
- 10 2. Mutante nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie die Nukleotidsequenz SEQ. ID No. 1 des Sequenzprotokolls aufweist.
- 15 3. Mutante der FSAP, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Mutante an der Aminosäureposition 393 einen Glu/Gln-Austausch und/oder an der Aminosäureposition 534 einen Gly/Glu Austausch aufweist.
- 20 4. Mutante nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie die Aminosäuresequenz SEQ. ID No. 3 des Sequenzprotokolls aufweist.
- 25 5. Diagnostische Verfahren zum Erkennen von Personen mit genetisch bedingter hetero- oder homozygoter Expression der FSAP, **dadurch gekennzeichnet**, dass man die Mutante gemäß den Ansprüchen 3 und 4 in der genomischen DNA oder in der davon abgeleiteten mRNA nachweist.
6. Diagnostische Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass man die Mutante auf der Proteinebene nachweist.
- 30 7. Monoklonale oder polyklonale Antikörper, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie gegen die Mutante gemäß den Ansprüchen 3 oder 4 gerichtet sind.

8. Diagnostische Verfahren zum Erkennen von Patienten mit genetisch bedingter hetero- oder homozygoter Expression der FSAP, **dadurch gekennzeichnet**, dass man die Mutante gemäß den Ansprüchen 3 und 4 durch Verwendung von Antikörpern nach Anspruch 7 nachweist.

5

9. Diagnostische Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass man

10

a) eine Probe, die die Mutante gemäß den Ansprüchen 3 oder 4 enthalten könnte, mit einem auf einem festen Träger fixierten ersten Antikörper gemäß Anspruch 7 inkubiert und danach wäscht, dann einen zweiten, markierten Antikörper gemäß Anspruch 7 oder gegen den Wildtyp gerichteten markierten Antikörper zugibt und abermals auswäscht und das vom zweiten Antikörper hervorgerufenen Signal misst oder

15

b) eine Probe, die die Mutante gemäß den Ansprüchen 3 oder 4 enthalten könnte, mit einem auf einem festen Träger fixierten ersten Antikörper gegen den Wildtyp inkubiert und danach wäscht, dann einen zweiten, markierten Antikörper gemäß Anspruch 7 zugibt und abermals auswäscht und das vom zweiten Antikörper hervorgerufenen Signal misst oder

20

25

c) auf einem Träger die auf das Vorliegen der Mutante gemäß den Ansprüchen 3 oder 4 zu untersuchende Probe fixiert und sie mit einem markierten Antikörper gemäß Anspruch 7 allein oder in Mischung mit einem unmarkierten Antikörper und anschließendem Nachweis des markierten Antikörpers detektiert oder

d) einen auf einem Träger fixierten Antikörper gemäß Anspruch 7 mit einer auf das Vorliegen der Mutante gemäß den Ansprüchen 3 oder 4 zu unter-

suchenden Probe in Gegenwart einer markierten Mutante versetzt und das durch die Markierung hervorgerufene Signal misst.

10. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**,
5 dass man die Aktivität der FSAP misst, indem man die

- die Protease enthaltende Probe an einem festen Träger inkubiert, an den zuvor ein gegen die Protease gerichteter Antikörper nach Anspruch 7 gekoppelt wurde, und

10

- nach Auswaschen des freien Trägers die daran fixierte Protease mit Reagenzien inkubiert, die deren Aktivitätsbestimmung erlauben.

11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aktivität der Protease durch eine photometrische Bestimmung der bei der Einwirkung auf chromogene Substrate auftretenden Extinktion gemessen wird.
15

12. Verfahren nach den Ansprüchen 10 und 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aktivität der Protease gemessen wird durch
20

20

- ihre die Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa und V/Va inaktivierende Wirkung oder

25

- ihre die Blutgerinnungszeiten verkürzende Wirkung in globalen Gerinnungstests oder

- ihre Plasminogenaktivatoren aktivierende Wirkung oder

- ihre den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Wirkung.

30

13. Verfahren nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die die Plasminogenaktivatoren aktivierende Wirkung gemessen wird durch die Aktivierung der

5 - Einketten-Urokinase (scuPA, single chain urokinase plasminogen activator) oder des

- Einketten-tPA (sctPA, single chain tissue plasminogen activator).

10 14. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Antikörper nach Anspruch 7 zur Detektion der Mutanten auf Western blots, zur Immunhistologie, Fluoreszenz-unterstützten Cell Sorting (FACS) oder vergleichbaren Methoden verwendet werden.

15 15. Testsysteme zur Durchführung diagnostischer Verfahren nach den Ansprüchen 5 bis 13.

20 16. Verfahren zur Präparation der Protease-Mutanten nach Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass einer oder mehrere Antikörper nach Anspruch 7 an einem Träger fixiert werden, das Immunadsorbens mit der Probe inkubiert und anschließend gewaschen wird und danach die Mutante durch Elution gewonnen wird.

25 17. Herstellung der Mutanten durch rekombinante und/oder transgene Expression.

18. Verfahren zur Präparation der Mutanten nach Ansprüchen 1 bis 3, 16 und 17 aus Körperflüssigkeiten, Zellkulturüberständen und Flüssigkeiten transgener Tiere.

19. Verwendung der Mutanten nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Protease zur Prophylaxe und/oder Therapie von Blutungen, bei angeborenen und erworbenem Mangel von FVIII, von Willebrand Faktor, FV, FIX, FX, FXI, FXII und/oder gegen diese Proteine gerichtete Antikörper, eingesetzt werden.
- 5

Aventis Behring GmbH
Postfach 12 30

35002 Marburg

Zusammenfassung:

Mutante der den Faktor VII aktivierenden Protease

Es wird eine Mutante der DNA-Sequenz beschrieben, die für die den Blutgerinnungsfaktor VII und die Einketten-Plasminogenaktivatoren aktivierende Protease (FSAP) kodiert, wobei die Mutante an der Nukleotidposition 1177 einen G/C-Basenaustausch und/oder an der Nukleotidposition 1601 einen G/A-Basenaustausch aufweist. Die entsprechende Protease weist an der Aminosäureposition 393 einen Glu/Gln-Austausch und/oder an der Aminosäureposition 534 einen Gly/Glu-Austausch auf. Es werden diagnostische Verfahren beschrieben, die zum Erkennen von Patienten mit genetisch bedingter hetero- oder homozygoter Expression der FSAP dienen.